



Congrega
Urcamp 2016

13ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa

REVISTA DA JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA ISSN:1982-2960

Propagação *in vitro* e aclimatização de *Mentha piperita* L.

FLÁVIA ANGELO BEDUHN¹, SIMONE RIBEIRO LUCHO², CRISTINI MILECH³, ALÍCIA MORAES KLEINOWSKI⁴, DÉBORA BARWALDT DUTRA⁵, MARINA FRANCO GALLI⁶, EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA⁷

RESUMO

A hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), também conhecida como menta ou sândalo é uma erva aromática anual ou perene, com ramos de cor verde escura a roxa purpúrea, originária da Europa. É muito utilizada como condimento, bem como para fins medicinais, alimentícios e cosméticos. O óleo essencial extraído de suas folhas é rico na mistura de mentol (50%), mentona e mentofurano, os quais são responsáveis pelo seu agradável odor. O óleo essencial extraído das suas folhas possui muitas propriedades, dentre elas antiespasmódica, anti-inflamatória, antiúlcera e antiviral. O cultivo *in vitro* tem importante papel na produção de plantas medicinais no que diz respeito à independência da variação sazonal, a produção em massa, identificação e produção de clones com as características desejadas e a manipulação do microambiente para maior produção do metabólito de interesse, em larga escala, curto período e espaços reduzidos. O objetivo deste trabalho foi otimizar um protocolo de micropropagação de hortelã-pimenta, visando a produção de mudas uniformes e de boa qualidade fitossanitária. Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados segmentos nodais de plantas cultivadas em casa de vegetação, desinfestados em soluções com hipoclorito de sódio na concentração de 1,0 % de cloro ativo acrescidos de duas gotas de detergente, pelo tempo de exposição de 10 minutos. Após a assepsia os explantes foram inoculados em meio MS (100%), acrescido de 0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP (benzilaminopurina) e 0; 0,25 e 0,50 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). A aclimatização das plantas oriundas da fase de multiplicação *in vitro* foi realizada em garrafas de 2L tipo PET, utilizando como substrato casca de arroz carbonizada e solo. Aos 30 dias de cultivo, houve maior desenvolvimento dos brotos e gemas axilares, quando tratadas com 2,0 mg L⁻¹ de BAP, na ausência de ANA. O maior número de raízes formadas foi observado nos meios ausentes de BAP e com 0,5 mg L⁻¹ de ANA, enquanto a altura atingiu maiores proporções também na ausência de BAP e 0,25 mg L⁻¹ de ANA. A combinação dos reguladores de crescimento BAP e ANA é determinante para aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* de *M. piperita*, entretanto o uso de BAP não é necessário para aumentar a média da altura das plantas e nem para a formação de raízes. O número médio de brotações e de gemas axilares desenvolvidos durante o processo de aclimatização não é influenciada pelas combinações de BAP e ANA utilizadas na etapa de multiplicação *in vitro*, porém as maiores médias de altura das plantas aclimatizadas foram observadas nas plantas tratadas previamente com ANA.

Palavras-chave: plantas medicinais; micropropagação; hortelã -pimenta

In vitro propagation and acclimatization of *Mentha piperita* L.

ABSTRACT

Peppermint (*Mentha piperita* L.), also known as menta or sândalo is an annual aromatic herb, perennial with dark green purple branches from Europe. They are commonly used as condiments, as well as for medical, food and cosmetic purposes. The essential oil extracted from its leaves is rich in the mixture of menthol (50%), menthone and menthofuran, which are responsible for its pleasant odor. The essential oil extracted from its leaves have many properties, like antispasmodic, anti-inflammatory, antiulcer and antiviral. *In vitro* culture plays an important role in the production of medicinal plants with regard to the independence of seasonal variation, mass production, identification and production of clones with the desired characteristics and manipulation of the microenvironment for increased production of the metabolite of interest, in large-scale, in short and tight spaces. The objective of this study was to optimize a protocol peppermint micropropagation (*M. piperita*), to the production of uniform seedlings and good quality plant. To establish *in vitro*, nodal segments of *M. piperita* were used, plants were grown in a greenhouse disinfected in solutions with sodium hypochlorite at 1.0% of active chlorine plus two drops of detergent, the exposure time was 10 minutes. After aseptic explants from setting step, represented by nodal segments and inoculated in MS medium (100%), added to 0; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ BAP (benzilamonipurine) and 0; 0.25 and 0.50 mg L⁻¹ of NAA (naphthaleneacetic acid). The acclimatization of plants from *in vitro* multiplication phase was held in 2L PET type bottles, using as substrate carbonized rice husk and soil. After 30 days of cultivation, there was further development of buds and axillary buds when treated with 2.0 mg L⁻¹ BAP, in the absence of ANA. We observed that the greater number of roots were formed in medium absent of BAP and 0.5 mg L⁻¹ NAA, while the height also reached greater proportions in the absence of BAP and 0.25 mg L⁻¹ NAA. The combination of growth regulators BAP and NAA is crucial for increasing *in vitro* multiplication of *M. piperita*, however the use of BAP is not necessary for increasing the average height of the plants or the formation of roots. The average number of shoots and axillary buds developed during the acclimatization process is not influenced by combinations of BAP and ANA used *in vitro* multiplication stage, but the greatest averages of shoot height of acclimatized plants were observed in plants treated with ANA previously.

Keywords: medicinal plants, micropropagation, peppermint

INTRODUÇÃO

A hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), também conhecida como menta ou sândalo é uma erva aromática anual ou perene, com ramos de cor verde escura a roxa purpúrea, originária da Europa. São muito utilizados como condimentos, bem como para fins medicinais, alimentícios e cosméticos (POOVAIAH et al., 2006).

As propriedades espasmolíticas, antivomitativas, carminativas, estomáquicas e anti-helmínticas são eficazes por via oral, quando as folhas são ingeridas na forma de chá, obtido pelo processo de infusão, porém seu uso tópico possui atividade antibacteriana, antifúngica e antiprurido. O óleo essencial extraído de suas folhas por hidrodestilação é rico na mistura de mentol (50%), mentona e mentofurano, os quais são responsáveis pelo seu agradável odor (LORENZI; MATOS, 2002).

Garlet et al. (2007) estudaram um quimiotipo de menta, rico em linalol (composição média de 48%) e carvona (composição média de 13%) de grande interesse econômico. O linalol entra na composição de cosméticos e a carvona é um importante agente antimicrobiano contra bactérias e fungos patogênicos, daí o emprego em produtos antissépticos. Possui também atividade inseticida, atuando contra moscas das frutas, larvas de insetos, inclusive sobre *Aedes aegypti* o vetor da dengue hemorrágica (CARVALHO; FONSECA, 2006).

A propagação da menta ocorre preferencialmente por rizomas ou estolões, já que os híbridos, em geral, produzem sementes estéreis pela infertilidade do grão de pólen e têm alto número de ploidia (WANG et al., 2009). Assim, a pureza dos diferentes genótipos de *Mentha officinalis* é mantida por meio da propagação vegetativa, o que é muito importante, pois as características morfológicas e bioquímicas são preservadas (BHAT et al., 2002).

O cultivo *in vitro* tem importante papel na produção de plantas medicinais no que diz respeito à independência da variação sazonal, a produção em massa, identificação e produção de clones com as características desejadas e a manipulação do microambiente para maior produção do metabólito de interesse, em larga escala, curto período e espaços reduzidos (MACIEL et al., 2000).

Na cultura de tecidos as auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas, onde a disponibilidade e interação das mesmas são responsáveis pela formação de raízes, partes aéreas e calos nas estruturas utilizadas como explantes (SKOOG; MILLER, 1957). Porém, cada genótipo apresenta uma resposta diferente para este balanço estabelecido entre os hormônios de crescimento, tornando necessário o estudo individualizado de cada cultivar (PÉREZ-TOMERO, 2000). A presença de raízes e a altura da planta obtidas na etapa de multiplicação *in vitro* são de fundamental importância para o sucesso do processo de aclimatização.

Este trabalho teve por objetivo otimizar um protocolo de micropropagação de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) visando a produção de mudas com melhor qualidade fitossanitária.

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Botânica, no Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas.

Multiplificação *in vitro*

Segmentos nodais de hortelã-pimenta, de aproximadamente 1 cm de comprimento, foram lavados em água destilada, sob agitação por 15 minutos. Posteriormente, o material foi imerso em etanol 70% por 10 segundos, seguida de uma tríplice lavagem com água estéril e nova imersão em soluções de hipoclorito de sódio (1,0%) acrescido de duas gotas de detergente, por 10 minutos. Na sequência, os segmentos nodais foram lavados três vezes em água estéril e secas com papel filtro.

O meio de cultura básico foi constituído da concentração de sais e vitaminas do MS (Murashige; Skoog, 1962), adicionada de 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 30g L⁻¹ de sacarose, sem suplementação hormonal. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 7 g L⁻¹ de ágar. Foram utilizados frascos tampados com papel alumínio, contendo 25 mL de meio, os quais foram autoclavados a 121°C a 1,5atm por 20 minutos. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento durante 30 dias com 16 horas de fotoperíodo, densidade de fluxo luminoso de 48 µmoles m⁻²s⁻¹, promovidas por lâmpadas fluorescentes branca-fria e com temperatura de 25 ± 2°C.

Para o desenvolvimento de múltiplos brotos foram utilizados os sais minerais e constituintes orgânicos do meio de cultura do MS, acrescidos de 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, três concentrações de BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e de três concentrações de ANA (0,0; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹) totalizando 9 tratamentos (Tabela 1).

TABELA 1- Identificação dos meios de cultura para a multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*).

Identificação do meio	Composição básica
M1	MS
M2	MS + 0 mg L ⁻¹ de BAP + 0,25 mg L ⁻¹ de ANA
M3	MS + 0 mg L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg L ⁻¹ de ANA
M4	MS + 1,0mg L ⁻¹ de BAP + 0 mg L ⁻¹ de ANA
M5	MS + 1,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,25 mg L ⁻¹ de ANA
M6	MS + 1,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg L ⁻¹ de ANA
M7	MS + 2,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,0 mg L ⁻¹ de ANA
M8	MS + 2,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,25 mg L ⁻¹ de ANA
M9	MS + 2,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg L ⁻¹ de ANA

Os explantes permaneceram em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, densidade de fluxo luminoso de $48 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-fria e com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 30 dias de cultivo foram avaliados números de brotos, números de gemas axilares, número de raízes e altura obtidas em cada explante.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, fatorial 3X3, sendo três concentrações de BAP e três concentrações de ANA, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um frasco com cinco explantes. .

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do software WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002). O número de brotos foi transformado para raiz quadrada de $x+0,5$, onde x é o número médio obtido, enquanto os dados do número médio de gemas axilares, de raízes e altura obtidos em cada explante não foram transformados.

Aclimatização

As plantas utilizadas neste experimento foram produzidas através do ensaio descrito anteriormente, as quais se desenvolveram sob as condições estabelecidas conforme os tratamentos prescritos na Tabela 1.

Os recipientes utilizados para o desenvolvimento das plantas *ex vitro* foram constituídos de garrafas plásticas de 2 L, tipo PET, adaptadas com perfurações, de maneira que o excesso de água não permanecesse no fundo. Estes continham como substrato uma mistura de terra e casca de arroz carbonizada na proporção de 1:1

O material permaneceu sob 24 horas de fotoperíodo, densidade de fluxo luminoso de $48 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, disponibilizada por lâmpadas fluorescentes branca-fria e com temperatura de $18 \pm 5^\circ\text{C}$, sendo realizadas regas periódicas a cada quatro dias. Após 30 dias de transplante foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos, número de gemas axilares e altura obtida em cada planta.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3X3, sendo três concentrações de BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L^{-1}) e três concentrações ANA (0,0; 0,25 e 0,5 mg L^{-1}). Cada tratamento foi constituído de três repetições, onde cada repetição foi composta por três explantes.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as média dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do software WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002). Os dados do número de gemas axilares e de brotos obtidos foram transformados em raiz quadrada de $X+1$, onde x

corresponde ao número médio obtido. Os valores da altura (em mm) não foram transformados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento de multiplicação *in vitro* (Tabela 2) demonstram que houve efeito significativo nos diferentes tratamentos utilizados, onde foi possível observar que o aumento das concentrações de BAP promoveu um aumento nas brotações formadas, produzindo o máximo de 5,75 brotos/explantes, na combinação de 2,0mg L⁻¹ de BAP sob a ausência de ANA.

Estudos realizados por Phatak; Heble (2002) com *Mentha arvensis* L. cultivados em meio MS suplementados com apenas BAP, também observaram o desenvolvimento de múltiplas brotações. Bosembecker (2001) em seu trabalho de multiplicação *in vitro* de camomila romana (*Anthemis nobilis* L.) constatou que o número de brotos atingiu o desenvolvimento máximo quando em concentrações de 0,3 e 0,45 mg L⁻¹ de BAP em diferentes concentrações de meio MS, apresentando 52,29 e 67,56 brotações/explante, respectivamente.

TABELA 2- Número médio de brotações por explantes em *Mentha piperita* submetidas às diferentes concentrações de BAP e ANA

BAP (mg L ⁻¹)	ANA(mg L ⁻¹)		
	0	0,25	0,5
0	1,99 cA*	2,25 bA	2,30 bA
1	3,57 bA	3,49 aA	2,95 bA
2	5,75 aA	3,52 aB	3,94 aB

*Média seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Em *Hypericum perforatum*, Santarém; Astarita (2003) relataram que a combinação de citocininas e auxinas promoveu uma maior formação de brotos, e que o número médio variou com o tipo de citocinina utilizado, onde BAP apresentou resultados superiores que as demais, desenvolvendo 40,6 brotos/explante, após 60 dias de cultivo sob as concentrações de 1,4 mg L⁻¹ combinado com 0,009 mg L⁻¹ de ANA.

Através dos resultados obtidos para o número médio de gemas axilares (Tabela 3), verificou-se que houve diferença estatística significativa entre os tratamentos utilizados, sendo que as melhores médias foram observadas na combinação de 2,0 mg L⁻¹ de BAP sob ausência de ANA (13,12 gemas axilares/explante).

TABELA 3- Número médio de gemas axilares por explante em *Mentha piperita*, submetidas às diferentes concentrações de BAP e ANA

BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)		
	0	0,25	0,5
0	6,28 bA*	8,38 aA	8,86abA

1	8,50bA	7,90aA	7,14bA
2	13,12aA	7,60aB	10,12aAB

*Média seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Em camomila comum (*Matricaria chamomilla*), Souza (2004) observou que as diferentes concentrações de BAP e de ANA aplicadas tiveram influência significativa sobre esta variável, apresentando a formação média máxima de 19,7 e 18,16 gemas axilares/explantes na combinação de 0,2 mg L⁻¹ de BAP e ausência de ANA, ou na concentração de 0,05 mg L⁻¹, respectivamente. Ressalta ainda, que maiores concentrações de BAP produziram os melhores resultados para o desenvolvimento dos explantes, demonstrando efeitos semelhantes à deste trabalho. Para a variável número médio de raízes (Tabela 4) houve interação significativa entre as concentrações de BAP e ANA, apresentando máximo de 15,48 raízes formadas por explante, quando utilizado apenas ANA na concentração de 0,5 mg L⁻¹.

TABELA 4- Número médio de raízes por explante em *Mentha piperita* submetidas às diferentes concentrações de BAP e ANA

BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)		
	0	0,25	0,5
0	6,92 aB *	10,10 aB	15,48 aA
1	2,10 bA	1,52bA	0,90 bA
2	1,44 bA	1,12 bA	4,16 bA

*Média seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Os tratamentos em que houve introdução de BAP no meio de cultura prejudicaram a formação de raízes. A ausência deste regulador de crescimento em meios de cultivo de *Anthemis nobilis* propiciou a formação de raízes (ECHEVERRIGARAY, 2000), enquanto a utilização de raízes adventícias de camomila romana em meios contendo ANA na concentração de 0,5 mg L⁻¹, tanto nas condições de luz, quanto no escuro propiciou proliferação satisfatória de raízes em cultura (OMOTO et al., 1998).

Para a variável altura média das plantas, a interação entre as diferentes concentrações de BAP e ANA testadas demonstrou diferença significativa nos valores obtidos (Tabela 5), apresentando melhores resultados sob concentrações de 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ de ANA e na ausência de BAP, atingindo 80,0 e 75,6 mm de altura respectivamente, os demais tratamentos mostraram resultados inferiores.

TABELA 5- Altura média (mm) obtida por explante em *Mentha piperita*, submetidas às diferentes concentrações de BAP e ANA.

BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)		
	0	0,25	0,5
0	48,4 aB *	80,0 Aa	75,6 aA
1	27,4 bA	20,2 bA	21,2 cA

2	31,2 bB	16,6 bC	49,6 bA
---	---------	---------	---------

*Média seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Para o número médio de brotações e de gemas axilares (Tabela 6) formadas na etapa de aclimatização observou-se que não houve efeito significativo dos fatores isolados, bem como de suas interações, não causando, portanto ação residual sobre o número médio de brotações formadas por explante na etapa de aclimatização.

TABELA 6- Número médio de gemas axilares formados em plantas de *Mentha piperita*, durante a fase de aclimatização, após serem submetidas às diferentes concentrações de BAP e ANA na multiplicação *in vitro*.

BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)		
	0	0,25	0,5
0	41,7 aA *	38,5 Aa	32,8 aA
1	43,2 aA	42,6 aA	31,8 aA
2	38,8 aA	54,6 aA	45,4 aA

*Média seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

A combinação das diferentes concentrações de BAP e ANA utilizadas na etapa de micropropagação não mostrou diferença significativa na altura média das plantas aclimatizadas, porém as concentrações de ANA demonstraram (Tabela 7), que as maiores médias de altura (225,7 mm) foram na concentração de 0,25mg L⁻¹ de ANA, enquanto que em concentração superior passou a ser prejudicial para o alongamento caulinar

TABELA 7- Efeito da concentração de ANA sobre a altura média (mm) obtida em plantas de *Mentha piperita*, durante a fase de aclimatização.

ANA (mg L ⁻¹)	Altura (mm)
0	196,4 b*
0,25	225,7 a
0,5	184,5 b

*Média seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%.

De forma semelhante a este experimento, Donini et al. (2003) relataram em seu trabalho com diferentes combinações de BAP e ANA em meio MS, que para a variável altura da planta, em manjericão verde (*Ocimum basilicum* L.), o melhor meio de cultivo *in vitro*, apresentava apenas ANA como fitorregulador, sob a concentração de 0,2mg L⁻¹ não havendo, a necessidade de acréscimo de BAP.

CONCLUSÕES

A combinação dos reguladores de crescimento BAP e ANA é determinante para aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* de *M. piperita*, entretanto o uso de BAP não é necessário para aumentar a média da altura das plantas e nem para a formação de raízes.

O número médio de brotações e de gemas axilares desenvolvidos durante o processo de aclimatização não é influenciada pelas combinações de BAP e ANA utilizadas

na etapa de multiplicação *in vitro*, porém as maiores médias de altura das plantas aclimatizadas são observadas nas plantas tratadas previamente com ANA.

REFERÊNCIAS

- BOSEMBECKER, V.K. **Efeito dos reguladores de crescimento na micropropagação e organogênese em camomila romana (*Anthemisnobilis* L.)**. Pelotas, 98p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), UFPel, 2001.
- BHAT, S. et al. *Menthaspecies: In vitro* regeneration and genetic transformation. **Molecular Biology Today**, v.3, n.1, p.11-23, 2002.
- CARVALHO, C.C.R.; FONSECA, M.M.R. Carvone: why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v.95, p.413-22, 2006.
- DONINI, L.P.; FERREIRA-MOURA, T.; SOUZA, J.A.; GUISSO, A.P.; PEREIRA-BARBOSA, L.; ROSA, D.L. da; VIÉGAS, J. Estabelecimento *in vitro* de espécies de Aráceas ornamentais: Desinfestação com diferentes concentrações de cloro ativo. In: **XIII CIC- Congresso de Iniciação Científica/VI ENPOS- Encontro de Pós- graduação**. Pelotas, UFPel, 2003.
- ECHEVERRIGARY, S.; BIASIO, S.; FRACARO, F. SERAFINI, L.A. Clonal micropropagation of roman chamomille (*Anthemisnobilis* L.). **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v.7, n.2, p.35-40, 2000.
- GARLET, T.M.B. et al. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.956-62, 2007.
- GUIA RURAL ABRIL. **As Culturas de A até Z**. Editora Abril S.A., São Paulo, SP, 1989. 447P.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. Nova Odessa, São Paulo, 2002, 543p.
- MACHADO, A., CONCEIÇÃO, A.R. **Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows**, versão 2.0. Pelotas, RS, 2002.
- MACIEL, A.L.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Aclimatização de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. **Ciências Agrotécnicas**, v.24, n.1, p.9-12, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised médium for rapid growth and biossays whit tobacco tissue cultures. **Physiological Plant**, v.15, p.473-497, 1962.
- OMOTO, T.; ASAI, I.; ISHIMARU, K. SHIMOMUR, K. Geranylisovalerate accumulation in adventitious root culture of *Anthemisnobilis*. **Phytochemistry**. V.48, n.6, p.971-974, 1998.
- PÉREZ-TORNERO, O.; EGEA J.; VANOOSTENDE, A. Assesment of factors affecting adventitious shoot regeneretion from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, v.158, p.61-70, 2000.

PHATAK, S.V. HEBLE, M.R. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. **Fitoterapia**, v.73, n.1, p.32-39, 2002.

POOVAIAH, C.R.; WELLER, S.C.; JENKS, M.A. Adventitious shoot regeneration of scotch spearmint (*Mentha gracilis* Sole) *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. v.42, p.354-8, 2006.

SANTARÉM, E.R.; ASTARITA, L.V. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. And hypericin production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.43-4

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.** v.11, p.118–131, 1957.

SOUZA, J.A. **Cultivo *in vitro* e caracterização isoenzimática de espécies de camomila**. Pelotas, 48 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), UFPel, 2004.

WANG, X. et al. Highly efficient *in vitro* adventitious shooter generation of peppermint (*Mentha piperita* L.) using internodal explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. v. 45, p.435-440, 2009.